

**Metode uji residu antibakterial secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada daging ikan dan udang  
– Bagian 3: *Enrofloxacin***





© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

|  |    |
|--|----|
| Daftar isi.....  | i  |
| Prakata .....  | ii |
| 1 Ruang lingkup.....   | 1  |
| 2 Istilah dan definisi .....   | 1  |
| 3 Prinsip.....   | 2  |
| 4 Peralatan .....  | 3  |
| 5 Bahan .....  | 3  |
| 6 Prosedur kerja .....   | 3  |
| 7 Perhitungan hasil.....   | 4  |
| 8 Intepretasi hasil.....   | 5  |
| 9 Pengendalian mutu hasil uji.....   | 5  |
| Lampiran A (normatif) Pembuatan larutan.....   | 6  |
| Lampiran B (informatif) Bagan alir ekstraksi contoh uji untuk analisis <i>enrofloxacin</i> .....   | 7  |
| Lampiran C (informatif) Bagan alir pengujian <i>enrofloxacin</i> dengan ELISA.....   | 8  |
| Lampiran D (informatif) Posisi standar <i>enrofloxacin</i> dan contoh uji pada sumuran ( <i>well</i> ) dan model kurva kalibrasi standar <i>enrofloxacin</i> ..... | 9  |
| Bibliografi .....  | 10 |
| Gambar B.1 - Bagan alir ekstraksi contoh uji untuk analisis <i>enrofloxacin</i> .....  | 7  |
| Gambar C.1 - Bagan alir pengujian <i>enrofloxacin</i> dengan ELISA.....  | 8  |
| Gambar D.1 - Kurva kalibrasi standar <i>enrofloxacin</i> .....   | 9  |
| Tabel D.1 – Susunan standar <i>enrofloxacin</i> dan contoh uji pada <i>well</i> .....  | 9  |



## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas, dan memberikan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (RSNI) tentang Metode uji residu antibakterial secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada daging ikan dan udang - Bagian 3: *Enrofloxacin*

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya, melalui rapat konsensus pada tanggal 9 November 2011 di Riau, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian, perguruan tinggi, serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.19/Men/2010 tentang Pengendalian sistem jaminan mutu dan keamanan hasil perikanan.
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.02/Men/2007 tentang Monitoring residu obat, bahan kimia, bahan biologis dan pencemaran pada pembudidayaan ikan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep. 26/2002 tentang Penyediaan, Peredaran, Penggunaan dan Pengawasan Obat Ikan;
6. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.20/2003 tentang Klasifikasi Obat Ikan;
7. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
8. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.
9. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. 116/DPB/HK.150.D4/I/2007 tentang Pedoman Pelaksanaan Monitoring Residu obat, bahan kimia, bahan biologi, dan atau kontaminan pada Pembudidaya Ikan.
10. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. 106/DJPB/2011 tentang Batas Maksimum Residu pada Komoditi Ikan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 9 April 2012 sampai 8 Juni 2012 dengan hasil akhir RASNI.



## Metode uji residu antibakterial secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada daging ikan dan udang — Bagian 3: *Enrofloxacin*

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan prosedur pengujian residu *Enrofloxacin* pada daging ikan dan udang dengan metode *enzyme linked immunoassay* (ELISA). Metode ini mampu menguji pada rentang 1 ng/ml sampai dengan 50 ng/ml.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **absorbansi**

penyerapan cahaya oleh partikel dalam suatu larutan dalam sistem optik pada ELISA reader

#### 2.2

##### **antibakterial**

suatu zat yang mampu membunuh, menghambat atau menekan kemampuan bakteri untuk bereproduksi

#### 2.3

##### **antibodi**

molekul *imunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintesis molekul ini di dalam sel dari seri limfoid (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut

#### 2.4

##### **antigen**

benda asing yang menyebabkan pembentukan antibodi bila dimasukkan ke dalam organisme. Antigen bisa berupa toksin dari bakteri, enzim, protein hewani dan nabati lain, atau sel nabati dan hewani

#### 2.5

##### **contoh uji**

sejumlah daging ikan dan udang yang akan diuji

#### 2.6

##### **dilution factor**

faktor pengenceran yang diperoleh dari penambahan volume larutan pengencer

#### 2.7

##### **ekstraksi**

proses pemisahan senyawa diantara dua fase zat yang tidak bercampur

#### 2.8

##### **enzim**

protein yang bertindak sebagai katalis biologis berfungsi mempercepat reaksi kimia di dalam jaringan organisme



**2.9**

**enzyme linked immunoassay (ELISA)**

teknik biokimia yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur suatu antibodi maupun antigen pada contoh uji

**2.10**

**enrofloxacin**

antibiotik jenis *fluoroquinolone* yang berperan dalam menghambat DNA gyrase bakteri

**2.11**

**evaporasi**

proses penguapan yaitu proses perubahan molekul zat cair menjadi gas atau uap air

**2.12**

**inkubasi**

pengkondisian campuran reaksi, dan semacamnya dalam lingkungan temperatur yang sesuai dan konstan selama kurun waktu tertentu agar tercapai hasil/akibat tertentu

**2.13**

**metabolit**

substansi yang memiliki ukuran molekul kecil yang merupakan produk antara maupun akhir dari suatu proses metabolisme dan pada umumnya, produk tersebut masih tetap ada pada saat akhir metabolisme

**2.14**

**peroxidase**

enzim yang mempunyai sifat mengoksidasi

**2.15**

**stop buffer**

larutan *buffer* untuk menghentikan reaksi enzim

**2.16**

**sumuran (well)**

lubang sumuran pada *microtiter plate* yang berisi antigen

**2.17**

**TMB substrate**

larutan 3,3',5,5' Tetramethyl benzidine

**3 Prinsip**

Metode deteksi *enrofloxacin* berdasarkan prinsip "*reaksi antigen – antibody*". Mikrotiter well telah dilapisi oleh antigen. Larutan standar atau contoh, *conjugate enzyme enrofloxacin* dan antibodi anti- *enrofloxacin* ditambahkan pada sumuran (*well*). *enrofloxacin* bebas dan *conjugate enzyme enrofloxacin* akan berikatan pada sisi aktif *antigen*. Ikatan *conjugate* akan diubah oleh *chromogen* menjadi larutan berwarna biru. Kemudian ditambahkan *stop solution* yang akan mengubah warna biru menjadi warna kuning, yang diukur dengan *microtiter plate reader* pada panjang gelombang 450 nm. Nilai absorbansi yang didapat berbanding terbalik dengan konsentrasi *enrofloxacin* di dalam contoh uji.



#### 4 Peralatan

- a) blender;
- b) *erlenmeyer*;
- c) ELISA reader/microtiter plate reader (450 nm/630 nm);
- d) freezer;
- e) gelas ukur;
- f) *micropipette* (20  $\mu$ l sampai dengan 200  $\mu$ l dan 200  $\mu$ l sampai dengan 1 000  $\mu$ l);
- g) *micropipette multichannel*;
- h) *mini mixer/ shaker*;
- i) pipet dispenser;
- j) pipet volumetrik;
- k) sentrifus;
- l) tabung reaksi;
- m) tabung sentrifus;
- n) timbangan analitik sensitivity 0,1 mg.

#### 5 Bahan

- a) akuabides;
- b) kertas tisu;
- c) *metanol 70%*.
- d) *antibody no. 2 diluent*;
- e) *enrofloxacin antibody no.1*;
- f) *100 x HRP-conjugated antibody no. 2*;
- g) *microtiter plate yang telah dilapisi oleh antigen enrofloxacin*
- h) larutan standar *enrofloxacin* (0 ng/ml; 0,1 ng/ml; 0,25 ng/ml; 0,5 ng/ml; 1,0 ng/ml; 5,0 ng/ml);
- i) *10x sample extraction buffer*;
- j) *stop buffer*;
- k) *TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) substrate*;
- l) *20x wash solution*.

**CATATAN** Pembuatan larutan diuraikan dalam Lampiran A.

#### 6 Prosedur kerja

##### 6.1 Preparasi contoh uji

- a) Lumatkan contoh uji (minimal 50 gram) dengan blender hingga homogen.
- b) Simpan contoh uji yang telah homogen pada wadah yang bersih dan tertutup.
- c) Jika contoh uji tidak langsung diuji maka simpan dalam freezer (-20 °C) sampai analisa akan dilakukan.

##### 6.2 Ekstraksi

- a) Timbang 1 gram homogenat contoh uji dalam tabung sentrifus 10 ml dan tambahkan dengan 4 ml metanol 70 %.
- b) Aduk campuran di atas selama 10 menit dengan menggunakan *mini mixer/shaker*.
- c) Sentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 6 000 rpm pada suhu ruang (20 °C sampai dengan 25 °C).
- d) Pindahkan 0,5 ml supernatan (lapisan atas) ke dalam tabung reaksi yang baru dan tambahkan 0,5 ml 1x *sample extraction buffer*, aduk dengan *mini mixer/shaker* hingga homogen.
- e) Ambil 50  $\mu$ l untuk proses pengujian ELISA.



**CATATAN** Bagan alir ekstraksi contoh digambarkan pada Lampiran B.

### 6.3 Proses pengujian ELISA

- Masukkan 50 µl masing-masing larutan standar *enrofloxacin* (0 ng/ml; 0,1 ng/ml; 0,25 ng/ml; 0,5 ng/ml; 1,0 ng/ml; 5,0 ng/ml) ke dalam beberapa sumuran (*well*) dengan dua kali ulangan (*duplo*). (Tabel D.1)
- Masukkan 50 µl masing-masing ekstrak contoh uji ke dalam sumuran (*well*) yang berbeda pula.
- Tambahkan 100 µl *enrofloxacin antibody* no.1 dan campurkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual selama 1 menit.
- Inkubasikan *microtiter plate* dalam kondisi tertutup dan gelap selama 30 menit pada suhu ruang (20 °C sampai dengan 25 °C).
- Buang cairan dari dalam sumuran (*well*) sampai benar-benar kering dengan cara mengetukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi oleh kertas tisu sehingga cairan dalam sumuran keluar semua.
- Cuci sumuran dengan 250 µl 1x *wash solution* sebanyak tiga kali.
- Setelah pencucian terakhir, balikkan *microtiter plate* dan ketukkan pada alas yang dilapisi oleh kertas tisu serta jangan biarkan *microtiter plate* mengering.
- Tambahkan 150 µl 1x *antibodi* no. 2.
- Inkubasikan *microtiter plate* dalam kondisi tertutup dan gelap selama 30 menit pada suhu ruang (20 °C sampai dengan 25 °C).
- Ulangi langkah e dan f.
- Tambahkan 100 µl *TMB substrate* pada setiap sumuran dan campur dengan cara menggoyang *microtiter plate* secara manual selama 1 menit.
- Inkubasikan selama 15 menit pada suhu ruang (20 °C sampai dengan 25 °C) dengan kondisi *microtiter plate* tertutup dan gelap.
- Tambahkan 100 µl larutan *stop buffer*.
- Baca absorbansi setiap sumuran (*well*) dengan *microtiter plate reader* (ELISA reader) pada panjang gelombang 450 nm dengan segera (tidak lebih dari 30 menit).

**CATATAN** Bagan alir pengujian *enrofloxacin* dengan ELISA digambarkan seperti pada Lampiran C.

**CATATAN** Posisi standar *enrofloxacin* dan contoh pada *well* digambarkan seperti pada Lampiran D.1

## 7 Perhitungan hasil

- kurva kalibrasi standar *enrofloxacin* dapat dibuat dari pembacaan % absorbansi setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/ml pada kurva logaritma.

$$\frac{B}{B_0} \% = \frac{\text{Absorbansi standar}}{\text{Absorbansi standar } 0 \text{ ng/ml}} \times 100\%$$

- masukkan hasil pembacaan % absorbansi contoh uji ke dalam kurva kalibrasi standar (Gambar D.1).
- nilai konsentrasi *enrofloxacin* pada contoh uji diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam nilai ng/g setelah dikalikan *dilution factor* 10.

**CATATAN** Model kurva kalibrasi standar *enrofloxacin* digambarkan seperti pada Lampiran D.2



## 8 Interpretasi hasil

Berdasarkan hasil perhitungan software *ELISA reader* hasil dinyatakan positif, bila nilai melebihi *cut off* yang telah ditentukan sesuai contoh grafik.

## 9 Pengendalian mutu hasil uji

Pengendalian mutu yang digunakan dengan persyaratan sebagai berikut:

- a) Semua reagen harus pro analisis (p.a)/ *grade reagent* (GR).
- b) Keluarkan reagen kit dan biarkan pada suhu ruang (20 °C sampai dengan 25 °C) selama 15 menit sampai dengan 30 menit sebelum digunakan.
- c) Simpan kembali semua reagen kit pada suhu 2 °C sampai dengan 8 °C dengan segera setelah digunakan.
- d) Pertahankan sumuran (*well*) selama pengujian agar tidak kering.
- e) Hindari sinar matahari langsung pada saat inkubasi. Sebaiknya tutupi *microtiter plate*.
- f) Semua reagen harus dicampur secara hati-hati hingga homogen. Siapkan reagen sesuai kebutuhan sumuran (*well*) yang digunakan.
- g) Jangan memasukkan kembali reagen yang telah disiapkan ke dalam botol stok.
- h) Gunakan barang-barang yang habis pakai untuk menghindari kontaminasi.
- i) Simpan kit pada suhu 2 °C sampai dengan 8 °C atau di lemari pendingin hingga masa berlakunya habis.
- j) Kondisikan *ELISA reader*, dengan cara menghidupkan 15 menit sebelum digunakan.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Pembuatan larutan**

**A.1 Larutan metanol 70 %**

Bahan:

- metanol 70 ml
- akuabides 30 ml

Cara membuat :

- Pipet 70 ml metanol dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml yang berisi 15 ml akuabides.
- Tepatkan volume menjadi 100 ml dengan akuabides.

**A.2 1x antibody #2**

Bahan:

- 100 x HRP-conjugated antibody #2
- antibody #2 diluent

Cara membuat :

Encerkan *HRP-conjugated antibody #2* 100 x dan *antibody #2 diluent* dengan perbandingan volume 1 : 99.

**A.3 1x sample extraction buffer**

Bahan:

- 10x *sample extraction buffer*
- akuabides

Cara membuat :

Encerkan 10x *sample extraction buffer* dengan akuabides dengan perbandingan volume 1 : 9.

**A.4 1x wash solution**

Bahan:

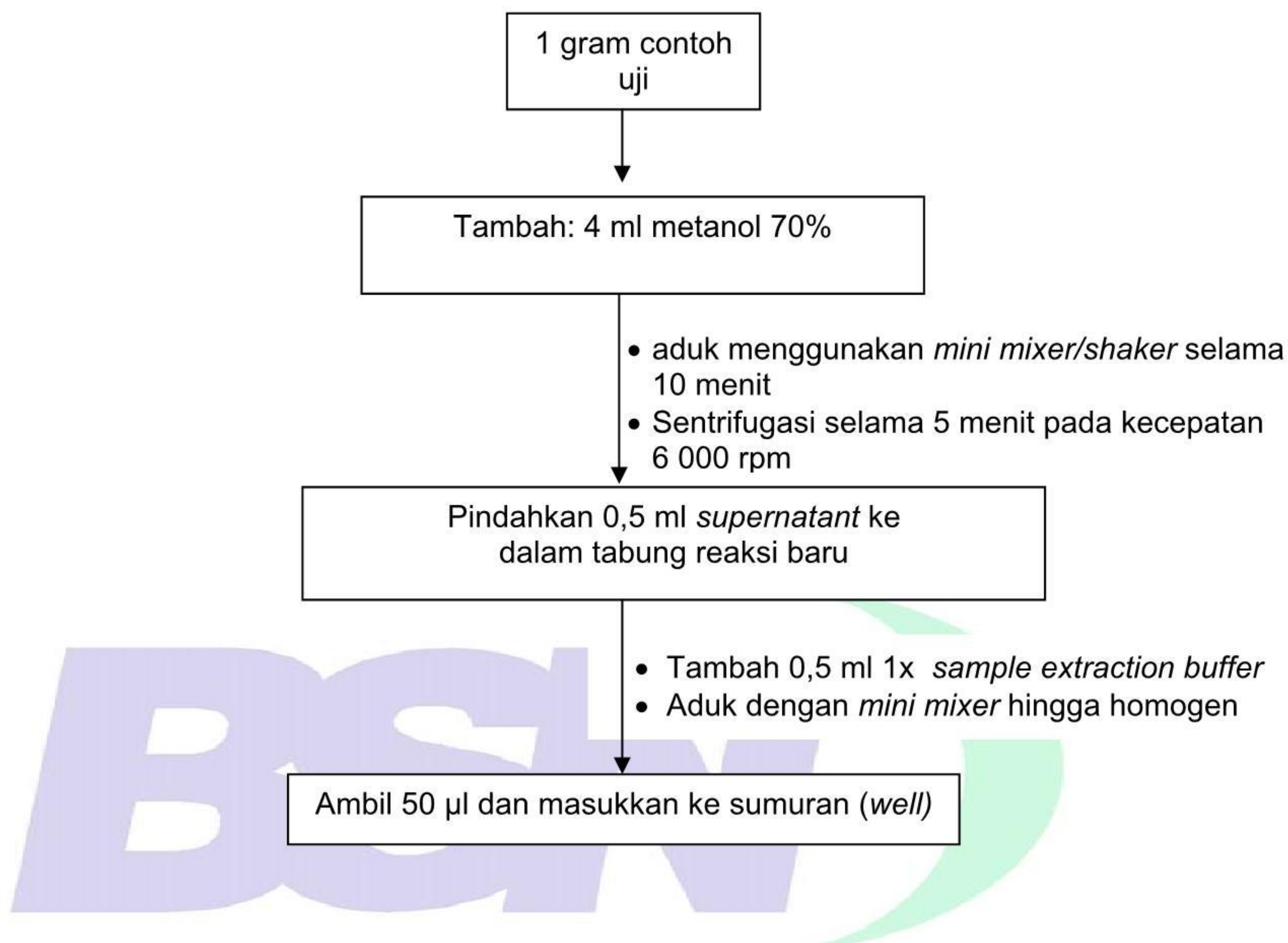
- 20x *wash solution*
- akuabides

Cara membuat :

Encerkan 20x *wash solution* (larutan pencuci) ke dalam akuabides dengan perbandingan 1 : 19.



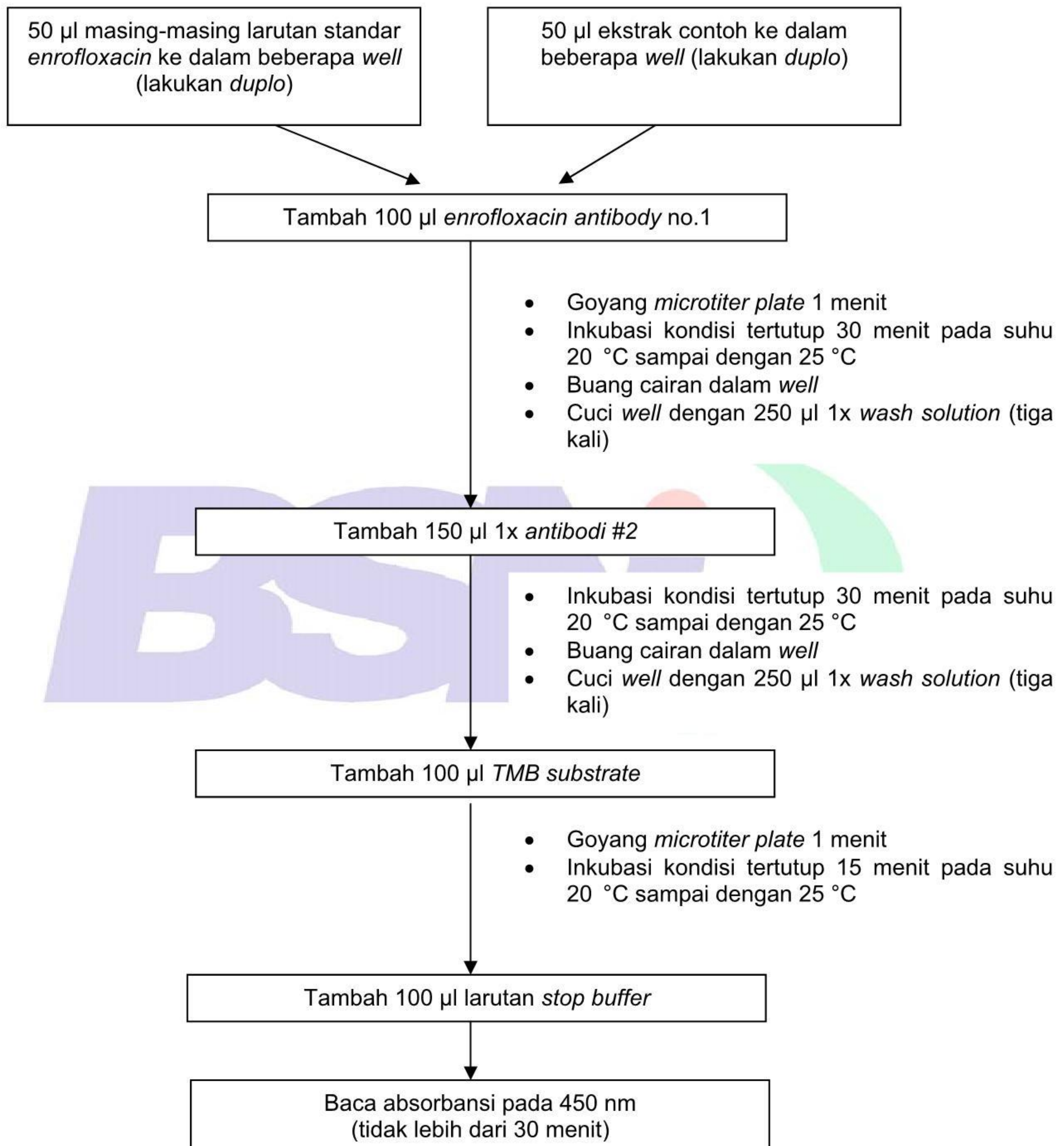
**Lampiran B**  
(informatif)  
**Bagan alir ekstraksi contoh uji untuk analisis enrofloxacin**



**Gambar B.1 - Bagan alir ekstraksi contoh uji untuk analisis enrofloxacin**



**Lampiran C**  
(informatif)  
**Bagan alir pengujian enrofloxacin dengan ELISA**



**Gambar C.1 - Bagan alir pengujian enrofloxacin dengan ELISA**



## Lampiran D (informatif)

### Posisi standar *enrofloxacin* dan contoh uji pada sumuran (*well*) dan model kurva kalibrasi standar *enrofloxacin*

#### D.1 Posisi standar *enrofloxacin* dan contoh uji pada *well*

**Tabel D.1 – Susunan standar *enrofloxacin* dan contoh uji pada *well***

|   | 1      | 2   | 3   | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|---|--------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A | S-0    | S-1 | C-3 | C-7  | C-11 | C-15 | C-19 | C-23 | C-27 | C-31 | C-35 | C-39 |
| B | S-0    | S-1 | C-3 | C-7  | C-11 | C-15 | C-19 | C-23 | C-27 | C-31 | C-35 | C-39 |
| C | S-0,1  | S-5 | C-4 | C-8  | C-12 | C-16 | C-20 | C-24 | C-28 | C-32 | C-36 | C-40 |
| D | S-0,1  | S-5 | C-4 | C-8  | C-12 | C-16 | C-20 | C-24 | C-28 | C-32 | C-36 | C-40 |
| E | S-0,25 | C-1 | C-5 | C-9  | C-13 | C-17 | C-21 | C-25 | C-29 | C-33 | C-37 | C-41 |
| F | S-0,25 | C-1 | C-5 | C-9  | C-13 | C-17 | C-21 | C-25 | C-29 | C-33 | C-37 | C-41 |
| G | S-0,5  | C-2 | C-6 | C-10 | C-14 | C-18 | C-22 | C-26 | C-30 | C-34 | C-38 | C-42 |
| H | S-0,5  | C-2 | C-6 | C-10 | C-14 | C-18 | C-22 | C-26 | C-30 | C-34 | C-38 | C-42 |

**Keterangan :**

S : kode larutan standar *enrofloxacin* (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 5,0) ng/ml;

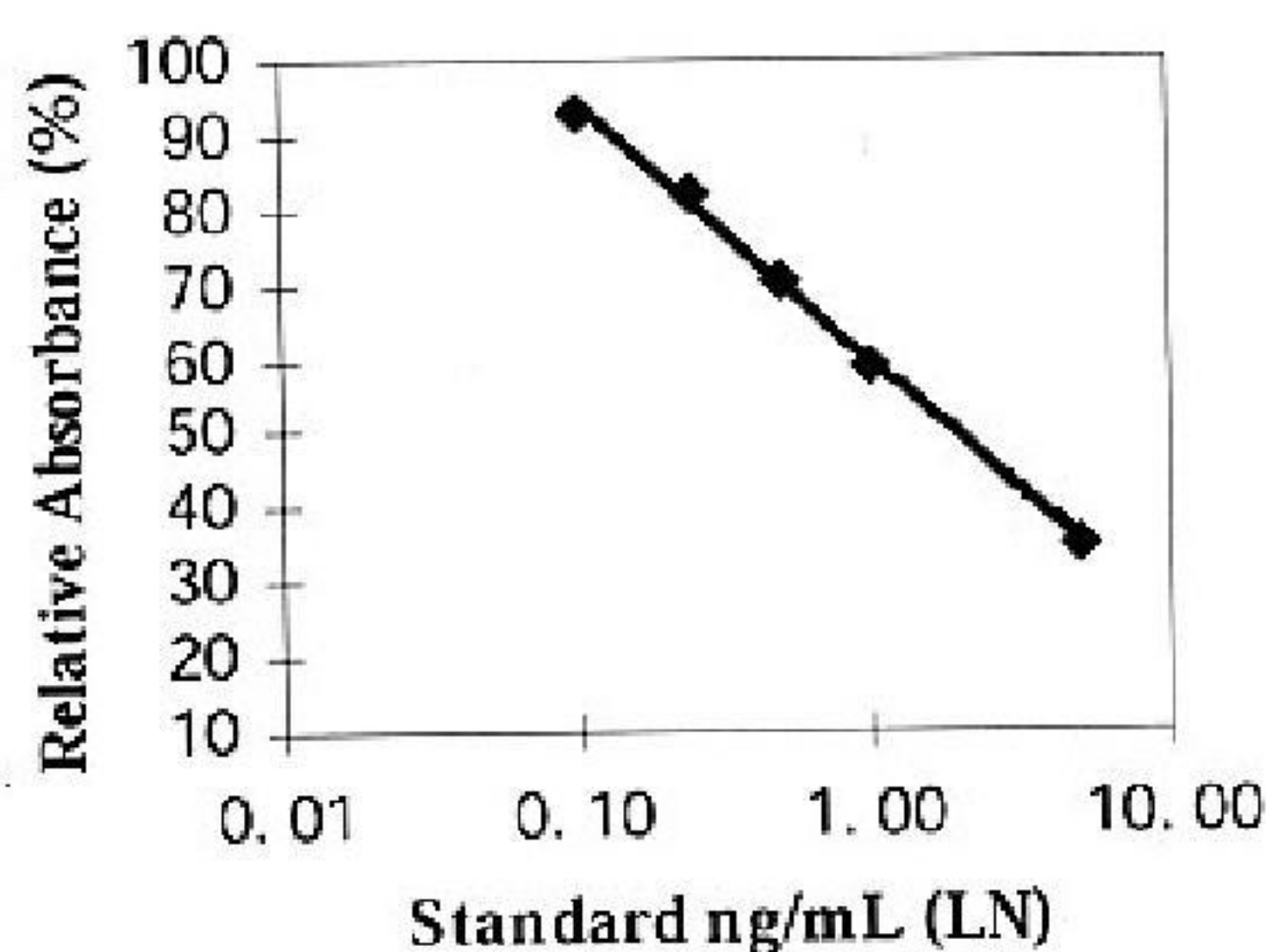
C : kode larutan contoh uji (C1 – C42);

Lajur A-H : posisi *well* vertikal;

Lajur 1-12 : posisi *well* horisontal.

#### D.2 Model kurva kalibrasi standar *enrofloxacin*

**Enrofloxacin Standard Curve**



**Gambar D.1 - Kurva kalibrasi standar *enrofloxacin***



## Bibliografi

MaxSignal™ *Enrofloxacin* ELISA Test Kit Manual.

